



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 196 31 395 A 1**

⑤1 Int. Cl.<sup>8</sup>:  
**G 01 N 33/533**  
G 01 N 21/64  
// C12Q 1/56

⑲ Aktenzeichen: 196 31 395.3  
⑳ Anmeldetag: 2. 8. 96  
㉑ Offenlegungstag: 5. 2. 98

DE 196 31 395 A 1

⑦1 Anmelder:  
BASF AG, 67063 Ludwigshafen, DE

⑦4 Vertreter:  
Bardehle, Pagenberg, Dost, Altenburg, Frohwitter,  
Geissler & Partner Patent- und Rechtsanwälte, 68165  
Mannheim

⑦2 Erfinder:  
Fuchs, Harald, Prof. Dr., 48301 Nottuln, DE; Friedrich,  
Thomas, Dr., 64283 Darmstadt, DE; Schrepp,  
Wolfgang, Dr., 69118 Heidelberg, DE

⑤4 Verfahren zum Wirkstoff-Screening

⑤7 Verfahren zum Wirkstoffscreening, wobei man den Wirkstoff über die mittels einer rasteroptischen Nahfeldmikroskopievorrichtung (SNOM-Vorrichtung) beobachtbare Änderung eines Signals [S] nachweist, sowie dafür geeignete Einrichtung, umfassend die SNOM-Vorrichtung, eine Einzel- oder Mehrfachprobenaufnahmevorrichtung und eine Steuerungseinrichtung.

DE 196 31 395 A 1

BEST AVAILABLE COPY

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Wirkstoff-Screening, insbesondere ein Verfahren zum Massenscreening im Wirkstoffbereich. Des weiteren betrifft die Erfindung die Verwendung einer Nahfeldmikroskopier-  
vorrichtung sowie eine Einrichtung umfassend eine Nahfeldmikroskopier-  
vorrichtung und eine Steuervorrichtung. Außerdem betrifft die Erfindung noch eine Nanotitervorrichtung.

Das Finden neuer Leitstrukturen, d. h. von molekularen Strukturen wie etwa Liganden, Agonisten oder Wirkstoffen, die bezüglich ihrer Wirkung auf Enzyme oder Rezeptoren, DNA-Nukleasen oder -Polymerasen, Proteasen wie z. B. Thrombin, Membranrezeptoren, Kernrezeptoren oder Bindeproteine verbessert sind, ist auch derzeit noch ein mühsamer und zeitaufwendiger Suchprozeß.

Der Erfolg hängt dabei in großem Ausmaße vom Zufall ab. Denn dabei müssen sehr viele Substanzen durchgemustert werden, bis aktive Substanzen gegen das Zielmolekül — etwa einen Rezeptor — gefunden werden. Viele Substanzen — etwa 100.000 bis 1.000.000 — auf ihre Bioaktivität hin zu überprüfen, dauert sehr lange, wenn man berücksichtigt, daß Aktivitätstests mit z. B. Zellen oder Enzymen lange Inkubationszeiten erfordern. Eine derartig große Substanzzahl kann daher nur dann schnell geprüft und untersucht werden, wenn auch der Test hochempfindlich und sehr schnell ist.

Vielfach werden bei solchen Tests Fluoreszenzverfahren eingesetzt. Diese sind zwar sehr empfindlich, aber auch störanfällig. Außerdem sind derartige Testverfahren auch sehr zeitaufwendig. Man muß nämlich berücksichtigen, daß von der eigentlichen Inkubation bis zum Meßvorgang noch eine Vielzahl weiterer Behandlungsschritte erforderlich ist. Dazu gehören hier vor allem Waschschrte, um die Hintergrundfluoreszenz zu verringern und um so das Signal-/Rauschverhältnis zu verbessern. Generell kann gesagt werden, daß Verbesserungen in der Empfindlichkeit der Detektionsverfahren zu einer Verlangsamung in der Geschwindigkeit eines Tests führen. Eine Lösung beider Probleme zugleich durch ein Testverfahren bzw. eine entsprechende Einrichtung schien bisher nicht möglich.

In jüngster Zeit kam es mit der Entdeckung der Rastertunnelmikroskopie (RTM; engl. STM) durch Binnig und Rohrer [G. Binnig, H. Rohrer, C. Gerber, E. Weibel, Phys. Rev. Lett. 49 (1982), 57] zu einer stürmischen Entwicklung auf dem Gebiet der höchst sensitiven sog. Rastersondenverfahren.

Bei der Rastertunnelmikroskopie wird eine metallische Spitze zeilenweise rasternd über eine leitende oder halbleitende Probe geführt. Mit dem bei sehr geringen Abständen zwischen Spitze und Probe auftretenden Tunnelstrom als Regelgröße läßt sich ein Höhenprofil und/oder Profil der elektronischen Struktur der untersuchten Oberfläche aufnehmen. Auf diese Weise lassen sich Strukturen mit einer atomaren Auflösung von etwa 0,1 nm unter normalen Laborbedingungen untersuchen. Im Jahre 1986 [G. Binnig, C.F. Quate, C. Gerber, Phys. Rev. Lett. 56 (1986) 930] erfolgte mit der Rasterkraftmikroskopie (Scanning Force Microscopy, SFM) eine Übertragung auf nichtleitende Proben. Damit wurde die Untersuchung von polymeren Materialien [G. Krausch, M. Hipp, M. Böltz, O. Marti, J. Mlynek, Macromolecules 28 (1995) 260] sowie biologischen Strukturen sogar unter physiologischen Bedingungen möglich [C. Bustamante, D. Keller, Physics Today, December 1995, 32].

Bei der SFM wird eine üblicherweise pyramidale Spitze aus Silicium oder Siliciumnitrid, die sich an einem weichen Hebelarm befindet, zur Abtastung der Probe verwendet. Die Auslenkung des Hebelarms wird in der Regel lichtoptisch gemessen und zur Rekonstruktion des Höhenprofils verwendet.

Wird statt der beschriebenen Spitze eine angespitzte Lichtleiterfaser, in die z. B. Laserlicht eingekoppelt wird, als Sonde über die Probe geführt und das je nach Eigenschaft der Probe reflektierte oder transmittierte Licht mit Hilfe von Fotodetektoren nachgewiesen, so gelangt man zur sog. rasteroptischen Nahfeldmikroskopie (Scanning Nearfield Optical Microscopy, SNOM oder auch NSOM genannt) [H. Heinzelmann, D.W. Pohl, Appl. Phys. A 59 (1994) 89; E. Betzig, J. Trautman, Science 257 (1992) 189]. Diese Verfahren erlauben bei Nutzung aller gängigen optischen Kontrastmechanismen wie Absorption, Reflexion, Polarisation, Fluoreszenz usw. durch Umgehung der in der konventionellen Optik auftretenden Beugungsbegrenzung eine sehr hohe Ortsauflösung bis hinunter in den nm-Bereich. Im Bereich der Fluoreszenzmikroskopie wird dabei eine Empfindlichkeit erreicht, die den Nachweis einzelner fluoreszierender Moleküle erlaubt [E. Betzig, R.J. Chichester, Science 262 (1993) 1422]. Ein Schema dieses Verfahrens ist in Fig. 1 angegeben.

Neben der vorstehend stellvertretend beschriebenen SNOM-Anordnung sind im Stand der Technik weitere Anordnungen beschrieben. So können tetraedrale Spitzen [Koglin J. et al, Photons and Local Probes. Proc. of the NATO Advanced Research Workshop. Ed. Mart O. et al. Kluwer Academic Publ. 1995] oder z. B. photoleitende Spitzen [Akamine S. et al, Proceedings. IEEE Micro Electro Mechanical Systems 1995, Seite 155] verwendet werden.

Im biologischen Bereich wurden mittels dieser Techniken erst vereinzelt Untersuchungen durchgeführt, z. B. S.Smith et al, Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng. 1855, 81 (1994) (Scanning Probe Microscopies II) oder D.M.N. Jondle et al, Chromosome Research 3, 239 (1995). In der zuletzt genannten Literaturstelle ging es dabei um die Untersuchung der Ultrastruktur polytärer Chromosomen aus der Speicheldrüse der Fruchtfliege mittels SFM.

Unter Berücksichtigung des vorstehend Gesagten ist es Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren zum Wirkstoff-Screening bereitzustellen, bei dem eine Vielzahl von Proben in möglichst kurzer Zeit untersucht werden kann. Dieses Verfahren soll nicht nur zeitsparend sein, sondern auch — im Vergleich zu den bislang üblichen Verfahren — möglichst wenig Arbeitsaufwand erfordern.

Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren gelöst, bei dem man den Wirkstoff über die mittels einer rasteroptischen Nahfeldmikroskopier-  
vorrichtung (SNOM-Vorrichtung) beobachtbare Änderung eines Signals [S] nachweist. Gegenstand der Erfindung ist also auch die Verwendung einer SNOM-Vorrichtung in Screening-Verfahren sowie eine Einrichtung, umfassend eine Nahfeldmikroskopier-  
vorrichtung, eine Einzel- oder Mehrfachprobenaufnahmeverrichtung und eine Steuereinrichtung zum Ansteuern der einzelnen Kompartimente der Einzel- oder Mehrfachprobenaufbewahrungsvorrichtung mit der SNOM-Vorrichtung.

Bevorzugte Ausgestaltungen der Erfindung sind Gegenstand der Unteransprüche.

Es zeigen:

Fig. 1 den grundsätzlichen Aufbau einer SNOM-Vor-

richtung, unter Verwendung einer Lichtleiterfaser

Fig. 2a) und b) die bei dem erfindungsgemäßen Screening-Verfahren unter Einsatz der SNOM ablaufenden Verfahrensschritte vor [a)] bzw. nach [b)] Zugabe einen Wirkstoff  $W_2$  und weitere Wirkstoffe  $W_x$  enthaltenen Lösung zu dem Komplex aus Rezeptor  $R_1$  und fluoreszenzmarkiertem Wirkstoff  $W_1$ ;

Fig. 3a) und b) die gleichen Verfahrensschritte wie in Fig. 2a) und b), außer daß die Anordnung von Rezeptor  $R_1$  und Wirkstoff  $W_1$  umgekehrt ist;

Fig. 4 die bei einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens nach Art einer Sandwich-Technik ablaufenden Verfahrensschritte;

Fig. 5 eine weitere Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens, bei der der unbekannte Wirkstoff  $W_x$  indirekt über Konformationsänderung des Rezeptors nachgewiesen wird.

Wie bereits erwähnt, ist auch Gegenstand der Erfindung ein Verfahren zum Wirkstoff-Screening, insbesondere im Bereich des Massen-Screenings, bei dem die SNOM-Technologie zum Einsatz kommt. Mit Hilfe dieser Technologie ist es möglich, die Fluoreszenz einzelner Moleküle nachzuweisen, wenn der Abstand zwischen Sonde und Probe im Bereich von einigen nm liegt. Allerdings ist bei dem erfindungsgemäßen Verfahren der Einsatz der SNOM-Technologie grundsätzlich nicht auf den Bereich der Fluoreszenzverfahren beschränkt. Vielmehr kann jedes Nachweisverfahren verwendet werden, bei dem der zu entdeckende neue Wirkstoff eine Änderung eines optischen Signals verursacht. Bei dem optischen Signal kann es sich folglich außer um Fluoreszenz auch um Absorption, Polarisation oder eine Änderung der Wellenlängenabhängigkeit dieser Eigenschaften handeln.

Auch die bei dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzte SNOM-Technologie ist nicht darauf beschränkt, daß — wie in den Fig. 1, 2 und 3 dargestellt — das optische Nahfeld mittels einer Lichtleiterfaser zur Verfügung gestellt wird. Es sind sämtliche rasteroptische Einrichtungen einsetzbar, solange sie ein Nahfeld bereitstellen, mit dem sich ähnliche Auflösungen erzielen lassen, wie es unter Einsatz einer Lichtleiterfaser möglich ist. Dazu gehören beispielsweise die vorstehend genannten tetrahedralen oder photoleitenden Spitzen.

Für das Wirkstoff-Screening läßt sich SNOM beispielsweise vorteilhaft in der folgenden Weise einsetzen:

Zunächst wird ein Rezeptor (Fig. 2) bzw. ein Referenzwirkstoff (Fig. 3) auf einer geeigneten Oberfläche eines Substrats immobilisiert. Der Begriff Rezeptor wird hier sehr umfassend verstanden. Dazu gehören etwa Fibrinogen, Endothelin, DNA oder RNA, Proteine und Lipide im weitesten Sinne, aber auch ganze Zellen oder Gewebestücke. Dieser zu immobilisierende Stoff wird nachfolgend auch als Molekül A bezeichnet. Bei dem Substrat kann es sich um einen mit Gold bedampften Siliciumwafer handeln, eine modifizierte, z. B. silanisierete Siliciumoberfläche oder auch andere ebene Substrate wie etwa Glimmer, Graphit usw. Auch können biologische Substrate eingesetzt werden. Dabei kann es jedoch erforderlich sein, diese zuvor auf den vorstehend genannten anorganischen Substraten zu immobilisieren. Der immobilisierte Rezeptor ( $R_1$ ) (Fig. 2) oder Referenzwirkstoff ( $W_1$ ) (Fig. 3) wird mit einem fluoreszenzmarkierten Wirkstoff ( $W_1$ -F) bzw. fluoreszenzmarkierten Rezeptor ( $R_1$ -F) belegt und sozusagen blockiert. Wird ein stärker bindender ein Wirkstoff  $W_2$  [Fig. 2b)] bzw. [Fig. 3b)] mit höherer Affinität hinzugegeben, so

wird der Referenzwirkstoff ( $W_1$ ) aus der Rezeptorbindungsstelle verdrängt und der Wirkstoff  $W_2$  gebunden. Damit wird der fluoreszenzmarkierte Wirkstoff  $W_1$  von der Oberfläche verdrängt (Fig. 2b). Der gleiche Vorgang tritt im umgekehrten Falle ein, wenn der Referenzwirkstoff  $W_1$  am Substrat fixiert ist und die beiden Wirkstoffe  $W_1$  und  $W_2$  um die Bindung an einem nicht fixierten, aber fluoreszenzmarkierten Rezeptor konkurrieren (Fig. 3). In beiden Fällen wird die durch die Lichtleiterfaser, die sich quasi direkt über dem Rezeptor befindet, registrierte Fluoreszenz reduziert oder geht sogar bis auf Null zurück. Sie kann aber auch lediglich moduliert werden, z. B. in ihrer Wellenlängenabhängigkeit geändert werden. In dem Falle ändert sich nicht die Intensität, sondern die Farbe der Fluoreszenz.

Ein besonderer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens unter Einsatz der SNOM-Technologie liegt darin, daß fluoreszierende Moleküle, die sich aufgrund von Diffusion frei in der Lösung bewegen, praktisch keine Rolle spielen. Sie werden von der SNOM-Sonde nämlich nicht detektiert. Das Volumen, aus dem die relevante Information bei Einsatz der SNOM resultiert, ist aufgrund der starken Abstandsabhängigkeit des Signals extrem klein. Es reicht von einigen nm<sup>3</sup> bis zu maximal einigen 10000 nm<sup>3</sup>. Dadurch spielen frei diffundierende fluoreszierende Moleküle bei diesem Verfahren keine Rolle, so daß sich ein sehr gutes Signal-/Rauschverhältnis ergibt. Dies wiederum hat gegenüber den bislang bekannten hochempfindlichen Meßverfahren den entscheidenden Vorteil, daß eine zeitaufwendige Nachbehandlung der Probe, z. B. durch mehrfaches Waschen, entfällt.

In Anbetracht dessen ist auch klar, daß es bei dem erfindungsgemäßen Verfahren nicht entscheidend ist, daß das Nahfeld durch einen Lichtleiter bereitgestellt wird. Jedes Verfahren, das ein entsprechendes Nahfeld bereitstellt, führt zu den o.g. Vorteilen.

Eine weitere Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist in Fig. 4 gezeigt. Diese unterscheidet sich von den in den vorstehend erläuterten Fig. 1 bis 3 dargestellten Verfahren dadurch, daß der neue Wirkstoff  $W_x$  direkt nachgewiesen wird. Zunächst bindet der unbekannte Wirkstoff  $W_x$  an den Rezeptor  $R_1$ . Dieser neue Wirkstoff  $W_x$  weist eine Domäne (\*) auf, von der er sich von dem bekannten Wirkstoff  $W_1$  unterscheidet. Zum Nachweis dieser Domäne steht eine bekannte molekulare Sonde, z. B. ein mit Fluorescein-isothiocyanat markierter Antikörper zur Verfügung. Dieser fluoreszenzmarkierte Antikörper wird an den Komplex aus Wirkstoff  $W_x$  und  $R_1$  binden gelassen. Auf diese Weise kann der Komplex unmittelbar über die detektierte Fluoreszenz nachgewiesen werden.

Eine weitere Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist in der Fig. 5 dargestellt. Diese Ausführungsform unterscheidet sich von der in Fig. 4 dargestellten dadurch, daß der Fluoreszenz-markierte Antikörper nicht unmittelbar an den unbekannten Wirkstoff  $W_x$  bindet. Der unbekannte Wirkstoff  $W_x$  ruft vielmehr bei der Bindung an den Rezeptor  $R_1$  eine Konformationsänderung im Rezeptor  $R_1$  hervor (allosterischer Effekt). Durch diese Konformationsänderung werden am Rezeptor neue strukturelle Domänen freigelegt. An diese Domänen wird eine molekulare biologische Sonde, z. B. ein fluoreszenzmarkierter Antikörper binden gelassen. So kann der neue Wirkstoff  $W_x$  indirekt durch die von ihm hervorgerufene Fluoreszenz nachgewiesen werden.

In vorstehend beschriebenen Fällen können die Wirk-

stoffe aus geeigneten Lösungsmitteln hinzugegeben werden, z. B. wäßrigen oder ethanologischen Salzlösungen oder geeigneten Lösungsmitteln. Die Messung kann selbst kann im Lösungsmittel oder an der getrockneten Probe erfolgen. Die Untersuchung der Wirkstoffe muß nicht einzeln erfolgen, sondern es können in gleicher Weise Mischungen von Wirkstoffen, auch Mischungen mit anderen Verbindungen, untersucht werden (vgl. Fig. 2). Eine Immobilisierung unter Benutzung von EUSA-Platten [96-Loch-Mikrotiterplatten] und entsprechenden Proben- und Lösungshandling-Systemen, d. h. etwa Pipettierautomaten für nanostrukturierte Systeme ist möglich. Natürlich können in gleicher Weise auch auf zellulären Strukturen fixierte Rezeptoren untersucht werden.

Die Immobilisierung des Moleküls — sei es Rezeptor, Ligand oder ein anderes Molekül z. B. Neurorezeptoren oder Rezeptoren auf Zellen des Immunsystems oder andere zelluläre Bindeproteine auf dem Substrat — kann kovalent oder nicht kovalent erfolgen. Eine nicht kovalente Immobilisierung erfolgt z. B. durch unmittlere Adsorption. Die Immobilisierung kann jedoch auch über kovalente Bindungen erfolgen, wenn das Substrat eine entsprechende aktivierte Oberfläche aufweist. Beispielsweise kann bei der Flüssigphasenadsorption (Self-Assembly [S. Akari et al., Adv. Mater. 7 (1995) 549]) eine Aktivierung der Substratoberfläche dadurch erfolgen, daß eine Thiolcarbon-Säure aufgebracht wird. Das Thiol bindet mittels Adsorption an das Substrat, z. B. eine Goldoberfläche, wobei die Säuregruppe nach außen weist.

Die Bindung des Moleküls A muß auch nicht direkt an die Substratoberfläche oder die Thiolcarbonsäure erfolgen. Sie kann auch indirekt sein. Beispielsweise kann zwischen der vorstehend genannten Thiolcarbonsäure und dem Molekül A, z. B. einem Protein, Rezeptor, Liganden usw. ein sog. Abstandshalter ["spacer"] angeordnet sein. Ein solcher Abstandshalter oder "spacer" ist Aminohexansäure oder Spermidin. Diese Moleküle können über ihre Aminogruppen an die vorstehend genannte Thiolcarbonsäure binden.

Danach erfolgt die Bindung des Moleküls, d. h. des Rezeptorwirkstoffs, Liganden o. ä. an die Substratoberfläche. Im vorstehend genanntem Falle erfolgt diese Bindung kovalent über den Abstandshalter.

Falls das Einfügen eines Abstandhalters zwischen der Substratoberfläche und dem zu untersuchenden Molekül A aus bestimmten Gründen, wie beispielsweise aufgrund von ungünstigen sterischen Konformationen noch nicht ausreichend ist, so kann der Schritt des Eintagens eines Abstandhalters auch mehrfach wiederholt werden. Beispielsweise können zwei oder mehr Moleküle des vorstehend genannten Abstandhalters Aminohexansäure aneinander gehängt werden. Eine Grenze in der Zahl der aneinander gehängten Abstandhalter ist erst dadurch gegeben, daß es bei einem zu großen Abstand zwischen der Oberfläche des Substrats und dem daran über den Abstandhalter zu bindenden Molekül A nicht mehr zu einer Immobilisierung im eigentlichen Sinne des Wortes kommt, da ein sehr langer Abstandhalter natürlich entsprechend flexibel ist und somit der Einsatz von SNOM unmöglich gemacht wird.

Aufgrund des Meßprinzips ist es ganz besonders vorteilhaft, daß eine Parallelisierung des Verfahrens möglich ist. Es können statt einer Lichtleiterfaser gleichzeitig mehrere Fasern verwendet werden. Der Nachweis der Fluoreszenz kann dann über Faserkoppler und/oder Detektorarrays erfolgen. Somit ist es möglich, mehrere

Näpfchen z. B. einer EUSA-Platte oder gar die ganze Platte mit in der Regel 96 Nachweisstellen direkt auszu-  
lesen.

Dies erfolgt jedoch vorteilhafterweise mit der erfindungsgemäßen Einrichtung, umfassend eine Nahfeldmikroskopiervorrichtung, eine Einzel- oder Mehrfachprobenaufnahmeverrichtung und eine Steuereinrichtung zum Ansteuern der einzelnen Kompartimente der Einzel- oder Mehrfachprobenaufnahmeverrichtung mit der SNOM-Vorrichtung. Natürlich kann auch der Steuerungsvorgang umgekehrt ausgerichtet sein, d. h. mit der beweglichen Mehrfachprobenaufnahmeverrichtung läßt sich die Nahfeldmikroskopiervorrichtung ansteuern, ähnlich wie bei üblichen Mikroskopen der objektisch bewegt wird.

Als Mehrfachprobenaufnahmeverrichtung weist diese Vorrichtung vorteilhafterweise eine Mehrloch-Mikrotiterplatte auf, wie sie z. B. auch bei EUSA-Tests verwendet wird. Vorzugsweise handelt es sich bei einer derartigen Mehrfachprobenaufnahmeverrichtung um eine solche, deren Abmessungen zwecks Erhöhung der Geschwindigkeit des erfindungsgemäßen Wirkstoff-Screening-Verfahrens miniaturisiert sind. In diesem Falle ist die Untergrenze für die Größe (Durchmesser) der einzelnen Kompartimente lediglich durch die Größe der Lichtleiterfaser festgelegt. Die Untergrenze liegt dadurch bei etwa 10 nm.

Nach oben hin gibt es grundsätzlich keine Begrenzung. In Hinsicht auf die Optimierung der Geschwindigkeit des Screening-Verfahrens ist es aber nicht sehr effektiv, wenn die Größe des Kompartiments bei der miniaturisierten Vorrichtung einige 100 µm, insbesondere 500 µm überschreitet. Eine bevorzugte obere Grenze liegt bei 150 µm.

Bei einer derartig miniaturisierten Aufnahmevorrichtung ist es für die Optimierung der Geschwindigkeit auch nicht mehr nötig, daß das Einzelkompartiment, das die Probe enthält, die Form eines Lochs ("well") aufweist, wie sie von den üblichen Mikrotiterplatten bekannt ist. Als Strukturen können z. B. durch Lithographie und/oder Ätz- sowie Stempelprozesse hergestellte Vertiefungen, Näpfchen oder auch metallische Erhebungen z. B. in oder auf Silicium oder anderen Materialien wie z. B. Kunststoffen oder Glas dienen. Denkbar ist auch die Verwendung von Aufdampfstrukturen oder solchen, die durch Self-Assembly-Verfahren hergestellt werden. Auch nach dem LIGA-Verfahren hergestellte Mikrostrukturen können verwendet werden.

Zum noch schnelleren Ablesen eines Kompartiments reicht es aus, wenn dieses die Form eines Napfs, Trogs oder einer flachen Vertiefung aufweist. Die in dieser Hinsicht vorteilhafteste Ausgestaltung der bei dem erfindungsgemäßen Verfahren bzw. der erfindungsgemäßen Einrichtung eingesetzten Mehrfachprobenaufnahmeverrichtung besteht einfach aus einer sehr flachen planaren Scheibe, auf der die zu untersuchenden Proben in Form von kleinen Tröpfchen aufgesetzt sind. Falls als Substrat ein Si-Wafer verwendet wird, auf den die Proben in Form von Tröpfchen aufgesetzt sind, ist es bevorzugt, wenn die betreffenden Stellen sich in ihrer Oberflächenstruktur von der Umgebung unterscheiden. Beispielsweise ist es im Falle, daß der Wafer mit Gold bedampfte Bereiche aufweist, bevorzugt, daß die einzelnen Kompartimente mit Gold unterlegt sind, während das hydrophobe Silicium die einzelnen Kompartimente voneinander abtrennt.

Die gesamte Einrichtung, umfassend die Nahfeldmikroskopiervorrichtung, die Einzel- oder Mehrfachpro-

benaufnahmeverrichtung mit Kompartimenten für Proben und die Steuereinrichtung, kann so modifiziert sein, daß die Steuereinrichtung statt der SNOM-Vorrichtung die Mehrfachprobenaufnahmeverrichtung steuert, ähnlich wie bei im Bereich der Lichtmikroskopie üblichen Mikroskopen der objektisch bewegt wird — wie bereits vorstehend erwähnt.

Der Steuerungsmechanismus selbst kann ähnlich dem erfolgen, wie er aus anderen computergesteuerten Vorrichtungen dem Fachmann vertraut ist, z. B. aus Schrittmotorsteuerungen.

Generell können die einzelnen Kompartimente einer derartigen Mehrfachprobenaufnahmeverrichtung beliebig angeordnet sein, insbesondere aber in Rechteck- oder Kreisstruktur.

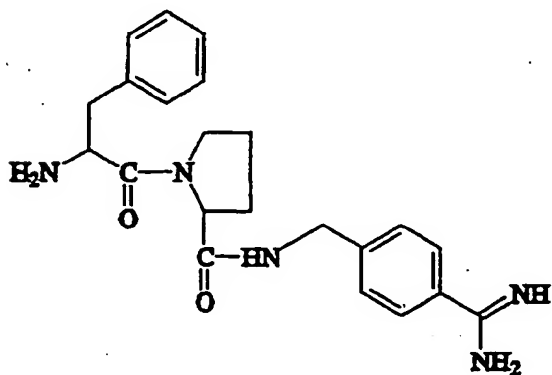
### Beispiele

Nachfolgend wird ein Beispiel für das erfindungsge-  
mäßige Verfahren gegeben:

Für den Nachweis einer Fluoreszenz wurde ein kommerzielles SNOM-Gerät (z. B. Aurora; TopoMetrix Inc.) eingesetzt. Als Substrat diente eine mit Gold bedampfte EUSA-Platte oder ein Si-Wafer. Mittels der Flüssigphasenadsorption (Self-Assembly) wurde darauf eine Thiolcarbonsäure aufgebracht. Das Thiol bindet an die Goldoberfläche, die Säuregruppen weisen nach außen. Hieran wurde über eine Peptidbindung der relevante Rezeptor, z. B. Avidin oder Thrombin immobilisiert.

Dies erfolgte dadurch, daß man die mit Carboxylgruppen modifizierte Oberfläche oder Spitze mit einem vorstehend erwähnten Abstandhalter (z. B. Aminohexansäure oder Spermidin) oder einem anderen Liganden derivatisierte. Dazu wurden die Carboxylgruppen des Substrats oder der Goldspitze mit je 100 mM N-Hydroxysuccinimid ( $C_4H_5NO_3$ ) und N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid(hydrochlorid)  $C_8H_{18}ClN_3$  fuhr 5 Minuten mit Aminohexansäure oder Spermidin, inkubiert (100 mM jeweils).

Die mit Aminohexansäure derivatisierte Oberfläche wurde danach erneut — wie oben beschrieben — mit N-Hydroxysuccinimid und N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid aktiviert. Danach wurde erneut mit dem aminogruppenhaltigen Ligand (z. B. Thrombin oder einem anderen Protein) in einer Konzentration von beispielsweise 100 µg/ml umgesetzt. Es können aber auch niedermolekulare Liganden wie z. B. folgender Thrombininhibitor an die Oberfläche gebunden werden.



Wurde als Abstandhalter Spermidin gewählt, so kann man die freie Aminogruppe des Spermidins mit einer

aktivierten Carboxylgruppe des Uganden umsetzen. Diese aktivierte Carboxylgruppe kann ebenfalls nach dem vorstehend beschriebenen Verfahren hergestellt werden. Es sind jedoch auch andere Verfahren einsetzbar, wie sie beispielsweise aus der Peptidsynthese zur Aktivierung von Carboxylgruppen bekannt sind:

- Aktivierung der Carbonsäuren zum gemischten Anhydrid mit Chlorameisensäure, EEDQ, IIDQ
- Aktivierung der Carbonsäure zum symmetrischen Anhydrid mit Carbodiimiden
- Aktivierung als Aktivester z. B. mit Carbodiimid, Uroniumsalzen des Benztriazols oder Uroniumsalzen allgemein und eventuell Pentafluorphenol, Hydroxysuccinimid, Hydroxybenzotriazol oder davon abgeleiteten Verbindungen
- als Halogenide bzw. Pseudohalogenide z. B. als Fluorid mit TFF, als Bromid mit BrOP oder als Azid.

Danach wurde fluoreszenzmarkiertes Avidin oder Thrombin hinzugegeben, das an den Referenzwirkstoff band. Folglich bildete sich ein fluoreszierender Komplex direkt an der Oberfläche des Substrats aus. Diese Einzelmolekül-Fluoreszenz konnte mittels SNOM nachgewiesen werden. Wurde nun eine Mischung mit einem effektiveren Wirkstoff hinzugegeben, so wurde das markierte Avidin bzw. Thrombin aus seiner Bindung befreit und diffundierte von der Oberfläche weg. Dadurch nahm die Fluoreszenz ab. Der in der zugegebenen Mischung enthaltene effektivere Wirkstoff muß aber nicht unbedingt an die gleiche Stelle binden wie der auf der Substratoberfläche immobilisierte Wirkstoff. Eine Verringerung der Bindung des mit Fluorescein markierten Moleküls kann auch durch Bindung an eine andere Stelle desselben erfolgen. Durch eine Beeinflussung der Konformation (allosterischer Effekt) wird dann die Affinität des fluoreszenzmarkierten Moleküls zu dem an der Substratoberfläche immobilisierten Liganden herabgesetzt, so daß nur noch ein geringerer Teil der fluoreszierenden Moleküle an der Oberfläche gebunden bleibt und somit die Fluoreszenz ebenfalls abnimmt.

Als Beispiel für zelluläre Strukturen, die als Substrat dienen können, seien insbesondere membranfixierte Rezeptoren genannt; neben den klassischen signaltransduzierenden Rezeptoren (z. B. G-Protein gekoppelten Rezeptoren, Liganden- und spannungsabhängigen Ionenkanälen) sind auch Rezeptoren auf Zellen des Immunsystems oder auf den Blutplättchen (z. B. GPIIb/III Rezeptoren) sowie reine Bindeproteine auf Zellen wichtige zelluläre Ziele.

### Patentansprüche

- Verfahren zum Wirkstoffscreening, wobei man den Wirkstoff über die mittels einer rasteroptischen Nahfeldmikroskopiervorrichtung (SNOM-Vorrichtung) beobachtbare Änderung eines Signals [S] nachweist.
- Verfahren nach Anspruch 1, wobei das rasteroptische Nahfeld mittels einer Lichtleiterfaser bereitgestellt wird.
- Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Wirkstoffscreening die Schritte umfaßt, daß eine Mehrfachprobenaufnahmeverrichtung mit mehreren Kompartimenten für Proben bereitgestellt wird und an allen oder einem Teil dieser Kompartimente, bevorzugt mittels einer parallelisierten

SNOM-Vorrichtung, die Schritte durchgeführt werden, daß

- a) ein Molekül A an ein Substrat direkt oder indirekt, kovalent oder nicht-kovalent gebunden wird,
- b) ein mittels der rasteroptischen Nahfeldmikroskopiervorrichtung mittels eines Signals [S] nachweisbares Molekül B nicht-kovalent an das Molekül A binden gelassen wird,
- c) eine einen Stoff X enthaltende Lösung hinzugegeben wird und die Anwesenheit des Stoffes X über die Änderung der Bindung des Moleküls B und damit des Signals [S] nachgewiesen wird.

4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Wirkstoff-Screening die Schritte umfaßt, daß eine Mehrfachprobenaufnahmeverrichtung mit mehreren Kompartimenten für Proben bereitgestellt wird und an allen oder einem Teil dieser Kompartimente — parallel oder nacheinander — die Schritte durchgeführt werden, daß

- a) ein Molekül A an ein Substrat binden gelassen wird,
- b) eine einen Stoff X enthaltende Lösung hinzugegeben wird,
- c) der Stoff X an A unter Bildung eines Molekülkomplexes A-X binden gelassen wird,
- d) eine Lösung, die eine molekulare Sonde P enthält, die über das Signal [S] mittels der rasteroptischen Nahfeldmikroskopiervorrichtung nachweisbar ist, zugegeben wird,
- e) die molekulare Sonde P an den Komplex A-X binden gelassen wird und
- f) die Bindung von P an A-X durch Messung von [S] nachgewiesen wird.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei es sich bei dem Signal [S] um ein Fluoreszenzsignal handelt.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Bindung des Moleküls A an das Substrat mittels Adsorption erfolgt.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei es sich bei dem Substrat um einen Si-Wafer, eine mit Au bedampfte Mikrotiterplatte, Glimmer, Graphit oder um eine zelluläre Struktur oder eine Kombination davon handelt.

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei es sich bei der zellulären Struktur um membranfixierte Rezeptoren handelt.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Molekül A an das Substrat indirekt über einen Abstandhalter, insbesondere Spermidin oder Amino-hexansäure gebunden wird.

10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei der Abstandhalter seinerseits über eine an das Substrat adsorbierte Verbindung gebunden wird.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei eine die SNOM-Vorrichtung umfassende parallelisierte Meßeinrichtung zum gleichzeitigen Nachweis mehrerer Probenkompartimente zum Wirkstoffscreening eingesetzt wird.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Signal [S] zum Nachweis der Bindung des Stoffes X einen optischen Kontrast verwendet, insbesondere Unterschiede in der Absorption, Fluoreszenz, Polarisation oder deren Wellenlängenabhängigkeit.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12,

wobei der Schritt des Bindens des Abstandhalters mehrfach wiederholt wird.

14. Verwendung einer rasteroptischen Nahfeldmikroskopiervorrichtung (SNOM-Vorrichtung) zum Wirkstoffscreening, wobei man den Wirkstoff über die mittels der rasteroptischen Nahfeldmikroskopiervorrichtung beobachtbare Änderung eines Signals [S] nachweist.

15. Verwendung nach Anspruch 14, wobei man eines der Verfahren nach Anspruch 1 bis 13 durchführt.

16. Einrichtung, umfassend eine Nahfeldmikroskopiervorrichtung, eine Einzel- oder Mehrfachprobenaufnahmeverrichtung mit Kompartimenten für Proben und eine Steuereinrichtung zum Ansteuern der einzelnen Kompartimente der Einzel- oder Mehrfachprobenaufnahmeverrichtung mit der Nahfeldmikroskopiervorrichtung.

17. Einrichtung, umfassend eine Nahfeldmikroskopiervorrichtung, eine Einzel- oder Mehrfachprobenaufnahmeverrichtung mit Kompartimenten für Proben und eine Steuereinrichtung zum Ansteuern der Nahfeldmikroskopiervorrichtung mit der Einzel- oder Mehrfachprobenaufnahmeverrichtung.

18. Einrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei es sich bei der Einzel- oder Mehrfachprobenaufnahmeverrichtung um eine Mehrfachloch-Mikrotiterplatte handelt.

19. Mehrfach-Nanotitervorrichtung, umfassend eine planare Platte sowie mehrere darauf angeordnete Nano-Kompartimente.

20. Mehrfach-Nanotitervorrichtung nach Anspruch 19, wobei die Größe der Kompartimente (Durchmesser) 10 bis 100 nm beträgt.

21. Mehrfach-Nanotitervorrichtung nach Anspruch 19 oder 20, wobei die Nano-Kompartimente in der Form napfartiger Vertiefungen vorliegen.

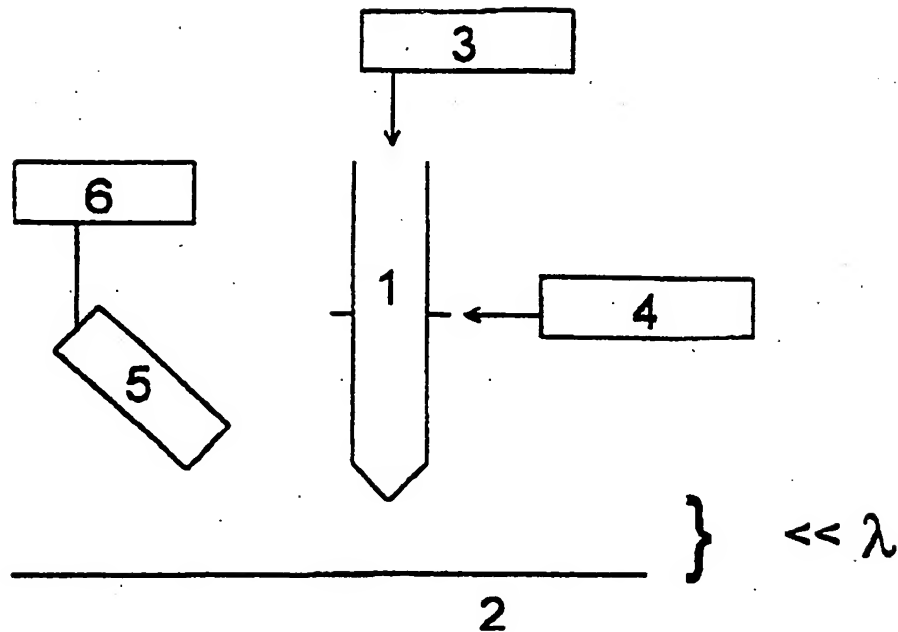
22. Mehrfach-Nanotitervorrichtung nach Anspruch 19 oder 20, wobei die Nano-Kompartimente von den übrigen Bereichen der planaren Platte dadurch abgegrenzt sind, daß ihre Größe (Durchmesser) durch eine von den letzteren sich unterscheidende andersartige chemische Struktur oder Zusammensetzung festgelegt ist.

23. Mehrfach-Nanotitervorrichtung nach einem der Ansprüche 19 bis 22, wobei es sich bei der planaren Platte um hydrophobes Silicium handelt und die Nano-Kompartimente durch eine Veränderung der Oberflächenstruktur festgelegt sind.

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

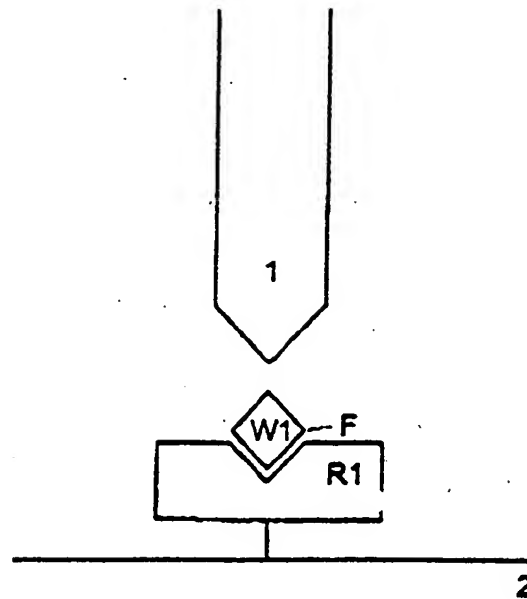
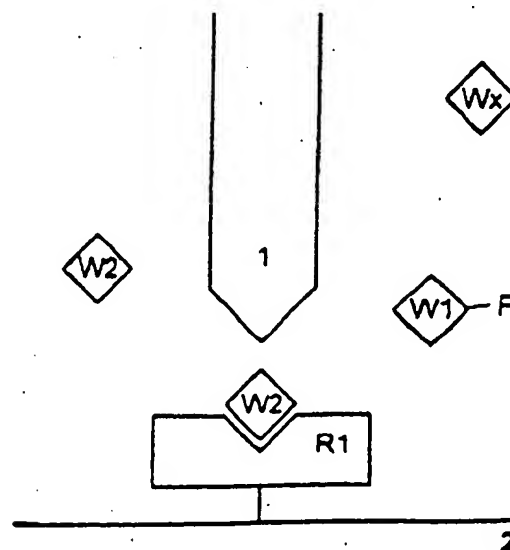
- Leerseite -



**Fig. 1:**

- 1: Lichtleiterfaser
- 2: Objekt/Substrat
- 3: Lichtquelle (z.B. Ar-Laser)
- 4: Steuereinheit für Lichtleiter
- 5: Photodetektor
- 6: Nachweiselektronik



**Fig. 2:****a)****1: Lichtleiterfaser****2: Substrat (z.B. Au bedampfter Si-Wafer, zelluläre Struktur))****R1: Rezeptor****W1: Wirkstoff****F: Fluoreszenzmarker****b)**

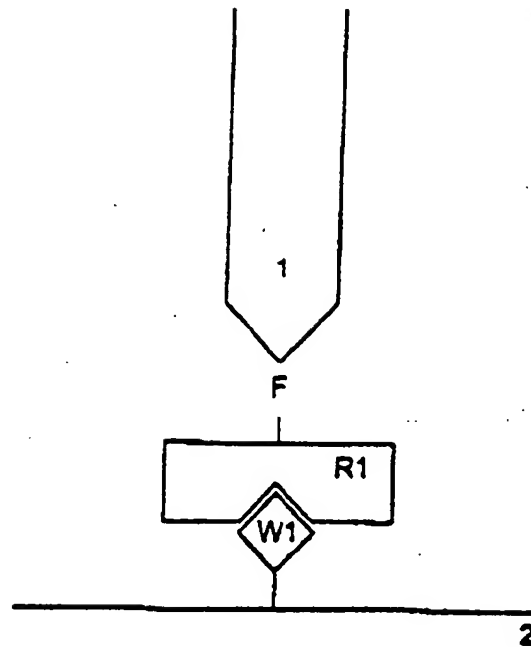
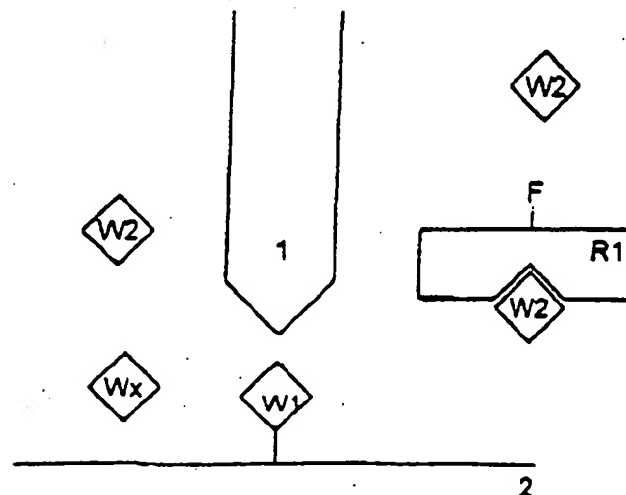
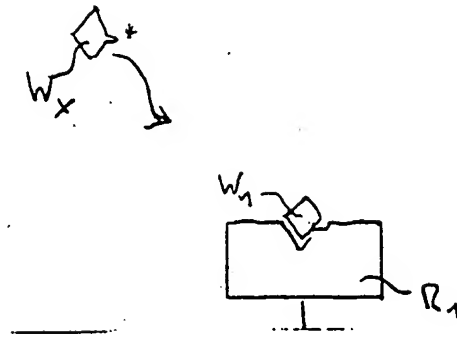
**Fig. 3:****a)****1: Lichtleiterfaser****2: Substrat (z.B. Au bedampfter Si-Wafer, zelluläre Struktur))****R1: Rezeptor, fluoreszenzmarkiert****W1: Wirkstoff****F: Fluoreszenzmarker****b)**

Fig. 4

"Sandwich"-Technik

1.



2.



3.

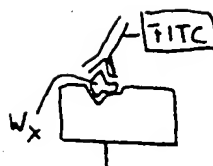
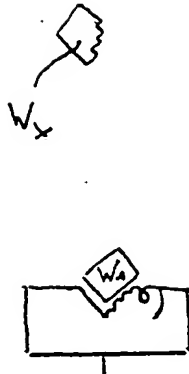


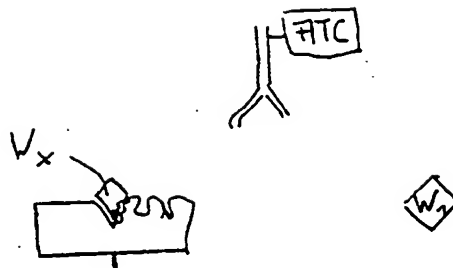
Fig. 5

"Allosterischer" Effekt

1.



2.



3.

